

[発明の名称]

細胞石灰化抑制活性タンパク質、及びそのタンパク質をコードする遺伝子

[発明の背景]

[発明の分野]

本発明は、細胞石灰化抑制活性タンパク質、及びそのタンパク質をコードする遺伝子に関する。

[関連する背景技術]

Etsは、当初、avian acute leukemia virusE26の癌遺伝子として見出された。最近、ヒトからショウジョウバエに至るEts関連遺伝子群が見いだされ、これらは細胞の増殖、分化の制御に基本的に重要な役割を持つ転写調節因子と想定されている。その一方、Ets gene superfamilyの生物学的作用はほとんど知られていない。

[発明の概要]

最近、Ets related gene(erg)が軟骨形成部位に特異的に発現していることが報告され、ergが初期の骨格形成に何等かの役割を果たす可能性が示された。本発明者らは係る知見に基づき、ニワトリ由来のerg遺伝子（以下、chickin-erg、又はc-erg遺伝子という）を骨芽細胞に導入し、c-ergの機能を解明することに成功し、本発明を完成するに至った。

[図面の簡単な説明]

この特許出願には色彩を含んだ少なくとも1つの図面を含んでいる。カラー図面を含んだこの特許のコピーは、請求および必要な費用の支払いにより、米国特許、商標庁から得ることができる。

図1は、c-ergのcDNAの塩基配列及びその演繹されるc-ergタンパク質のアミノ酸配列を示す（図中下線の部分が欠如した塩基配列が本発明に係るC-11遺伝子塩基配列である）。

図2は、c-ergタンパク質をコードする遺伝子ドメインを示す。ここでET Aはerg/ets転写活性ドメイン、NRTは転写活性抑制ドメイン、EDBはerg/etsDNA結合ドメイン、さらにCTAはカルボキシ末端転写活性ドメインを示す。

図3は、（実施例2-4）で得られたRT-PCR増幅産物を示す電気泳動の結果を示す写真である。473および392bpのバンドがそれぞれc-erg及びC-11に対応する。

図4は、Rcas（RCASのみ感染させた骨芽細胞）、c-erg-L14（c-ergセンス鎖導入RCASで感染させた骨芽細胞）、及びc-erg-L44（c-ergアンチセンス鎖導入RCASで感染させた骨芽細胞）のDNA合成能を比較した結果を示す。

図5は、Rcas（RCASのみ感染させた骨芽細胞）、C11-L14（C-11センス鎖導入RCASで感染させた骨芽細胞）のDNA合成能を比較した結果を示す。

図6は、Rcas（RCASのみ感染させた骨芽細胞）、c-erg-L14（c-ergセンス鎖導入RCASで感染させた骨芽細胞）、及びc-erg-L44（c-ergアンチセンス鎖導入RCASで感染させた骨芽細胞）のアルカリフォスファターゼ活性を比較した結果を示す。

図7は、Rcas（RCASのみ感染させた骨芽細胞）、C11-L14（C-11センス鎖導入RCASで感染させた骨芽細胞）のアルカリフォスファターゼ活性を比較した結果を示す。

図8は、感染なし骨芽細胞（上半分）と、RCASのみ感染させた骨芽細胞（下半分）培養系の石灰化細胞沈着をアリザリンレッド染色の結果を示す写真である。

図9は、c-erg-L14（センス鎖）RCASで感染した骨芽細胞（上半分）と、c-erg-L44（アンチセンス鎖）RCASで感染した骨芽細胞（下半分）の石灰化細胞沈着をアリザリンレッド染色で測定した結果を示す写真である。

図10は、RCASのみ感染させた骨芽細胞と、c-erg-L14（センス鎖）RCASで感染した骨芽細胞と、c-erg-L44（アンチセンス鎖）RCASで感染した骨芽細胞と、C11-L14（センス鎖）RCASで感染した骨芽細胞培養系の石灰化細胞沈着の程度をアリザリンレッド染色で測定した結果を示す写真である。

図11は、RCASのみ感染させた骨芽細胞と、c-erg-L14（センス鎖）RCASで感染した骨芽細胞と、c-erg-L44（アンチセンス鎖）RCASで感染した骨芽細胞と、C11-L14（センス鎖）RCASで感染した骨芽細胞の核への石灰化細胞沈着の程度をフォンコッサ（von Kossa）染色で測定した結果を表す写真であり（右2列）、さらに骨芽細胞の核をミヨウパンカルミンで二重染色した結果を示す写真である（左1列）。

[好適な実施例の説明]

本発明者らは、ニワトリ由来のerg遺伝子であるc-erg遺伝子の新規アイソフォーム遺伝子（以下C-11遺伝子、又はC11遺伝子とする）を見出し、その塩基配列を決定した。さらに、係る遺伝子によりコードされるタンパク質（C-11タンパク質、又はC11タンパク質という）の発現を確認した。

また、骨芽細胞に上記c-erg又はC-11遺伝子を導入することにより該細胞の石灰化が抑制されることを見出した。

より詳しくは、本発明は、以下の（a）又は（b）のC-11タンパク質を提供するものである。

（a）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、

（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞石灰化抑制活性を有するタンパク質。

また、本発明は、上記記載のタンパク質をコードする遺伝子を提供するものである。

さらに、本発明は、上記記載のタンパク質を含む医薬を提供するものであり、また、細胞石灰化抑制剤である医薬を提供するものである。

また、本発明は、以下の（a）又は（b）のc-ergタンパク質を含む細胞石灰化抑制剤を提供するものである。

（a）配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、

（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞石灰化抑制活性を有するタンパク質。

さらに、本発明は、C-11タンパク質に対する抗体を提供するものであり、また、前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗体を提供するものである。

さらに、本発明は、細胞中のC-11遺伝子又はc-erg遺伝子の発現を測定することにより、細胞の石灰化を測定する方法を提供するものである。

また、本発明は、上記遺伝子の発現を、前記C-11遺伝子又はc-erg遺伝子に特異的なDNA配列に対するプローブを用いて、細胞中に発現されたC-11 mRNA又はc-erg mRNA量を測定することにより測定する上記方法を提供するものである。

また、前記遺伝子の発現を、前記C-11又はc-ergタンパク質の細胞中での発現量を測定することにより測定する上記記載の方法を提供するものである。

さらに、上記C-11、又はc-ergタンパク質に対する抗体を用いて細胞中のC-11又はc-ergタンパク質の発現を測定する上記方法を提供するものである。

また、本発明は、上記細胞の石灰化測定法を用いて脊柱靱帯骨化症(OPPL)や変形性関節症などの病的石灰化や骨化をきたす疾患の診断方法を提供するものである。

また、本発明は、C-11タンパク質或いはc-ergタンパク質に対する抗体又はその両者を含む、細胞石灰化測定用キットを提供するものである。

さらに、本発明は、以下の(a)から(d)までのいずれか一つに記載のタンパク質をコードする遺伝子を用いて形質転換された細胞を用いて、細胞石灰化抑制作用阻害活性を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。

(a) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞石灰化抑制活性を有するタンパク質、

(c) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(d) アミノ酸配列(c)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞石灰化抑制活性を有するタン

パク質。

さらに、本発明は、*erg*タンパク質を含有する医薬を提供するものである。

また、本発明は、*erg*遺伝子を含有する医薬を提供するものである。

さらに、本発明は、C-11タンパク質又は*c-erg*タンパク質を含有する医薬を提供するものである。

また、本発明は、C-11遺伝子又は*c-erg*遺伝子を含有する医薬を提供するものである。

さらに、本発明は、*c-erg*タンパク質と、C-11タンパク質とに共通のアミノ酸配列を有するタンパク質を含有する医薬を提供するものである。

なお、本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などの略号で表示する場合、IUPAC-IUBによる略号あるいは当該分野における慣用の略号を使用した。

(核酸)

DNA    デオキシリボ核酸

cDNA   相補的DNA

RNA    リボ核酸

mRNA   メッセンジャーRNA

A       アデニン

C       シトシン

G       グアニン

T       チミン

発明の実施の形態

#### C-11遺伝子の単離、確認

本発明に係る新規遺伝子は、ニワトリ由来の*c-erg*遺伝子のアイソフォームである。図1に示されるように*c-erg*遺伝子の塩基配列に比較して、65

5番目塩基から735番目の81個のヌクレオチドが欠損した塩基配列を有するものである（配列表の配列番号1）。本発明に係る新規遺伝子、C-11遺伝子は、種々の細胞から、通常公知の方法により単離することが可能である。

具体的には、ニワトリ4日～10日胚より全RNA(total RNA)を抽出して、逆転写したのち、c-erg及びC-11遺伝子の全翻訳領域をPCR法により増幅可能である。

この際使用可能なプライマーとしては、例えばc-ergと、C-11を共に増幅するものとして以下のC11BおよびC11Cが挙げられる。

C11B: 5' -CACATTATGGCAAGCACTATTAAGG-3'

C11C: 5' -CACTTAGTAGTAGGTGCCAAGATGG-3'

C11A: 5' -ATCTTGATCACATTATGGCAAGC-3'

プライマーC11BとC11Cを使用した場合には、1446bpと1355bpの2本のバンドが出現し、1446bpはc-ergで、1355bpはC-11である。また、プライマーC11AとC11Cを使用した場合には、1454bp(c-erg)と1373b(C-11)の2種のDNAが増幅可能である。

いずれの場合もRT-PCR条件は、1μgの全RNAを逆転写し、次いで2unitのTaqポリメラーゼを使用して、61℃で1分、72℃で2分、95℃で10秒の30サイクルの増幅で検出可能となる。

また、決定された上記塩基配列に基づき適当な部分塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを作製することは容易であり、係るプローブを用いて、種々の方法により、C-11遺伝子の存在を確認することも可能となる。

#### C-11タンパク質。

C-11遺伝子の塩基配列から演繹されるC-11タンパク質は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するものである。

C-11タンパク質はまた、上記のC-11遺伝子をウイルスベクター（アデ

ノウイルスやニワトリレトロウイルス) に組込んで適当な細胞に発現させることが可能である (Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual by Michael Kriegler, W.H. Freeman and Company, New York (1991), p29-56.)。さらに、得られたタンパク質のアミノ酸配列は通常のアミノ酸配列分析装置によりその配列を直接決定することが可能である。

更には、配列表の配列番号 1 に記載の C-11 遺伝子の配列に、例えばサイトダイレクテッドミュータジェネシス法を用いて任意の塩基配列を置換、欠失、挿入することが可能である。上記サイトダイレクテッドミュータジェネシス法を 1 及至は数回繰返すことにより 1 及至は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入された c-11 タンパク質変異体及びそれをコードする遺伝子変異体を作製可能である。係る変異体も細胞石灰化抑制活性を有する限りは本発明の範囲である。

また、特定の細胞内で発現している C-11 タンパク質の検出には、公知の種々の方法が使用可能である。具体的には、C-11 タンパク質又はその部分タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色法、蛍光抗体法を用いて局在を調べる方法や、細胞をホモジネートしてラジオイムノアッセイや ELISA 法を用いて C-11 の発現量を測定する方法が挙げられる。

#### c-erg タンパク質

配列表の配列番号 4 に記載の c-erg タンパク質も、C-11 タンパク質と同様の方法により発現させることが可能である。

さらには、c-erg タンパク質又はその遺伝子の変異体も上記 C-11 タンパク質又は遺伝子のために用いたと同様の方法により作製可能であり、細胞石灰化抑制活性を有する限り本発明において満足に用いることができる。

#### C-11 タンパク質に対する抗体 (モノクローナル抗体) 。

本発明に係る C-11 タンパク質に対する抗体は、上記 C-11 タンパク質の

全部、又は一部のオリゴペプチドのいずれに対するものでもよい。さらに、特定の性質を付与するために抗体に適当な他の物質（タンパク質等）を結合したものも使用可能である。

上記タンパク質等を抗原とする免疫方法についても特に制限はなく、通常公知の免疫方法が使用できる。係る方法により、ポリクローナル抗体を含む血清が得られる。さらに、硫酸分画やProtein A Sepharoseを用いて精製することによりIgG等の特定の分画を得ることも可能である。

さらに、細胞融合法を用いて、モノクローナル抗体を作製することも可能である。

#### 細胞石灰化抑制活性

本発明に係るC-11遺伝子、又はc-erg遺伝子の導入による細胞石灰化抑制活性とは、上記遺伝子をクローニングしたウイルスベクターにより感染された骨芽細胞の石灰化誘導能が抑制されることをいう。ここで、細胞が誘導した石灰化物沈着量の測定方法は、具体的には、アリザリンレッド(Alizarin Red)法を使用することが好ましい。また、フォンコッサ(von Kossa、ミヨウバンカルミン法)法により容易に判別可能である。

#### 医薬及び医薬投与手段

また、本発明に係る医薬は、上記細胞の石灰化を抑制する作用を有するergタンパク質、erg遺伝子、C-11タンパク質、c-ergタンパク質、C-11遺伝子又はc-erg遺伝子を含有することを特徴とするものであり、従ってこれらによる細胞石灰化抑制に基づく種々の疾患、具体的には脊柱靱帯骨化症(OPLL)や変形性関節症などの病的石灰化が骨化をきたす疾患を治療し得るものである。

本発明が提供する医薬は、上記の、ergタンパク質、erg遺伝子、C-1

1タンパク質、c-e r gタンパク質、C-11遺伝子又はc-e r g遺伝子を含む医薬である。これらの医薬の投与手段は、特に制限されず、通常の投与手段が使用可能である。具体的には、局所注射、経皮注射、または経口投与などが挙げられる。さらには、細胞内へのマイクロインジェクション等が挙げられる。

より具体的には、c-e r g、C-11タンパク質を適当なホルモン等に結合し、あるいは融合したタンパク質として細胞に導入することにより、該ホルモン受容体にc-e r gやC-11が結合して共に細胞内に取り込ませることも可能である。

#### (実施例1) C-11遺伝子およびc-e r g遺伝子の単離

18日齢のニワトリ胚より胸骨を分離して、全RNAを抽出した(Ivanoto-M等、Microscopy Research and Technique(1994) 28: 483-491)。得られたRNAを逆転写後、c-e r gの全コーディング領域を増幅するPCRプライマー(C11AとC11C、もしくはC11BとC11C)を用いて61°Cで1分、72°Cで2分、95°Cで10秒の条件で30サイクル増幅を行うと、いずれのプライマー対(ペア)を用いた場合においても2本のバンドが得られた。それぞれのバンドを切出してQiaexII gel extraction kit(Qiagen, Germany)でDNA断片を確認した。これをPCR IIベクター(Invitrogen, CA, USA)にサブクローニングした後、全塩基配列をDideoxy法により決定した。その結果C11AとC11Cのプライマーペアで増幅された1454bp DNA断片はc-e r g (Mechanism of Development (1995) 50, 17-28)と完全に一致したが、1373bpのDNA断片の塩基配列は、c-e r gの655番目から735番目の81塩基が欠如した配列であった。この得られた新規な配列をC-11と名付けた。

また、C11BとC11Cのプライマーペアを用いて増幅されたDNA断片は、1446bpと1335bpの2種類であったが、前者はc-e r gであり、後者はC-11であった。

**00000000**

以下の（実施例2-1）から（実施例2-8）は、上記得られたc-erg遺伝子を用いて行った結果を示したが、同様に上記得られたC-11遺伝子を用いても行いその結果は以下c-ergの結果と共に示した。

(実施例 2-1) c-erg 遺伝子を有するベクターの調製

上記のクローニングしたc-e-r-gを、RCASベクター (Journal of Virology, Oct.1987、3004-3012頁参照) のClal siteに、センス(c-e-r-g)及びアンチセンス(AS-c-e-r-g)の向きにそれぞれサブクローニングした。上記センスまたはアンチセンスであることをDNAシーケンスに基づき確認した。

上記のサブクロニングしたc-*erg*及びAS-c-*erg*を有するRCASベクターをそれぞれニワトリ胚線維芽細胞にリン酸カルシウム共沈法(Chen, C and Okayama, H (1987), Mol. Cell Biol. 7, 2745-2752)を用いて導入し、導入細胞を10%牛胎児血清含有DMEM培地(日研生物科学研究所、京都)にて37℃で48時間培養した。その後、培養上清中に産生されたウイルスを、分子量3万カットの限外濾過膜により濃縮した(Centriprep, Amicon社, MA, USA) (以下virus-CMとする)。

上記と同様にして、R C A Sベクターのみをニワトリ胚線維芽細胞に導入し、導入細胞より回収されたウイルスを対照とした。

ここで本発明で使用した上記ニワトリ胚繊維芽細胞からのウイルスストックは以下に示した方法で作製した。すなわち、CEFにリン酸カルシウム法でRSV (Rous Sarcoma Virus) のv-srcを目的遺伝子で置換し、両端にLTRをもつプロウイルス構造を含むDNAをトランスフェクトした。遺伝子が導入された細胞は、一過性に多量のウイルスを放出する。その後はそのウイルスの感染によりトランスフェクション (transfection) に使用した培養系 (culture) すべてに伝搬することになる。この時期にウイルスストックを培地から回収した。より詳しくは、コンフルエントに増殖させたCEF (調製時から4～5日培養したもの) を $0.8 \times 10^6$  cellsずつ60mmディッシュにまいた。翌日リン酸カルシウム共沈法を用いて10 $\mu$ gのプロウイルス構造をもったDNA断片またはプラスミドをトランスフェクションで導入する。トランスフェクションの1～2時間前に培地を交換した。10時間後、培地を通常の培地で3回洗った後、2日間増殖を続けた。トランスフェクションしたculture全体を90mmディッシュに継代し、さらに2日増殖を続けた。培地を新鮮なものと交換し、48時間後の培地をウイルスストックとして回収した。再び培地を加え、12時間後に、2回目のウイルスストックを回収した。

#### (実施例2-2) c-erbB遺伝子の細胞への導入

Iwamoto等の方法に従い、c-erbB遺伝子をニワトリの骨芽細胞に導入してその影響を観察した (Iwamoto et al. J. Biol. Chem., (1993) 268(13): 9645-52))。上記骨芽細胞は、18日齢の頭頂骨を切り出し、その後、Louis. C.G.等の方法に従い骨芽細胞を分離して使用した (Developmental Biology, 122, p49-60(1987))。

実施例2-1で調製したウイルス-CM (及び対照のウイルス) を上記で調製した骨芽細胞に添加して、ウイルス感染を行った。

感染の有無は、細胞の分化形質の変化により確認し、ウイルス細胞への感染効

率は、骨芽細胞をP 1 9抗ウイルス抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank)を用いて染色することにより調べた (Potts.W.M. et al.J.Gen.Viol.,68,3177-3182(1982))。

#### (実施例2-3) c-erg遺伝子形質転換体の形態観察

実施例2-2で得られたウイルス感染骨芽細胞を、位相差顕微鏡(倍率10x)を用いて観察した。その結果、ウイルス感染骨芽細胞は、対照群細胞と比較した場合、サイズの小さな多角形の形態を示すことがわかった(図示せず)。

#### (実施例2-4) c-erg遺伝子、C-11遺伝子の発現の確認

前記アイソフォームC-11遺伝子の発現を確認するために、以下の方法に従いRT-PCR法を行った。

Iwamoto等(Iwamoto等、Microscopy Research and Technique 28, 483-491(1994))の方法によりニワトリ18日胚の胸脊組織の全RNAを調整した。このRNAを用いて、ランダムヘキサマーとスーパースクリプト逆転写酵素(共にGibco-BRL, MD, USA)によりDNAに変換した後、図2に示されるc-ergタンパク質遺伝子のETA領域(erg/ets転写活性領域)及び、NRT領域(転写活性抑制領域)の塩基配列を有するプライマーC11A、C11C(それぞれ配列表の配列番号5および7)を用いてPCR増幅反応を行った。図2において、ETAドメインとNRTドメインに挟まれた81塩基が欠損したものがC-11遺伝子である。得られた増幅産物を2%アガロースゲル上で電気泳動を行った結果を図3に示した。この結果2種類のmRNAが増幅され、c-erg遺伝子(473bp)とともにアイソフォームC-11遺伝子が392bpにバンドとして現われた。

#### (実施例2-5) DNA合成能の測定

c-erg形質転換体細胞のDNA合成能を以下のようにして測定した。

細胞を冷生理食塩水で3回洗浄した後、細胞を0.01N NaOHおよび0.2%(v/v) TritonX-100を含有する生理食塩水にて回収した。回収後、超音波により細胞を破壊して遠心し、上清を測定用サンプルとした。上清100 $\mu$ lに0.1g/mlのDABA(3,5-diaminobenzoic acid dihydrochloride)200 $\mu$ lを加え、遮光下45分間、65 $^{\circ}$ Cでインキュベートを行った後、2N HCl 300 $\mu$ lを加えて反応を停止した。反応停止後、420nmおよび510nmにおける蛍光を測定した。

ここで、Rcas (又はRCAS) はベクターのみを感染させた場合、c-erg-L14とは、c-ergのセンス鎖を導入したRCASを、また、c-erg-L44とは、c-ergのアンチセンス鎖を導入したRCASを意味する。さらに、C11-L14は、C-11のセンス鎖を導入したRCASを意味するものとする。

(実施例 2-6) アルカリホスファターゼ活性の測定

具体的には、細胞を氷上にて冷生理食塩水で3回洗浄した後、0.2%(v/v) Triton X-100を含有する生理食塩水にて回収した。回収後、超音波により細胞を破碎して遠心し、上清を測定用サンプルとした。

反応停止後410nmにおける吸光度を測定した。

c-ergを導入したRCASを用いた結果を図6に示した。対照となるRCASとc-erg-L44（アンチセンス鎖導入）間には有意の差はみられなかったが、c-erg-L14（センス鎖導入）はアルカリフォスファターゼ活性が顕著に抑制されることがわかった。

同様に、C-11を導入したC11-L14（センス鎖）の場合の結果を図7に示した。対照となるRCASと比較してアルカリフォスファターゼ活性が顕著に抑制されることがわかった。

#### （実施例2-7）Alizarin Red染色

培養した骨芽細胞（播種後12日目）を、PBS(phosphate buffer saline)で2回洗浄した後、100%エタノールで固定した。固定後1%アリザリン溶液（蒸留水にアリザリンレッドS(sodium alizarin sulfonate, 和光純薬)を1%になるように溶解し、0.1NH<sub>3</sub>でpH6.3~6.4に調整）を加えて細胞を2分間染色した。染色後蒸留水にて洗浄し、風乾した。

上記操作により、石灰化部位は橙赤色に染まる。

図8に播種後19日目に骨芽細胞培養系の石灰化物沈着量をアリザリンレッドで測定した結果を示した。感染されていない細胞(uninfected)及びRCASベクター自体を感染させた細胞は、同じ程度の石灰化物沈着が見られた。一方、c-erg-L14（c-ergセンス鎖導入RCAS）は、c-erg-L44（c-ergアンチセンス鎖導入RCAS）に比較して約半分であった。

さらに、図9は、C11-L14導入したRCASでは、アリザリンレッドで測定した結果、ほとんど石灰化物沈殿が見られないことを示している。

係る石灰化物沈着量の比較として図10には、アリザリンレッドによる染色の結果を示した。RCAS自体の感染した細胞では石灰化物沈着が明確に見られる条件で比較すると、c-erg-L44は極わずかな石灰化物沈着量の抑制が

見られるが、c-erg-L14ではほぼ石灰化物沈着が抑制されていること、さらに、C11-L14ではほぼ完全に抑制されていることがわかる。

#### (実施例2-8) von Kossa 染色

培養した骨芽細胞（播種後12日目）をPBSで2回洗浄した後、100%エタノールで固定した。その後細胞に1%硝酸銀水溶液を加え、直射日光下に30分曝した。次いで、細胞を蒸留水で洗浄し、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、5～10分間放置後、水洗を行う。核染色は水洗後、明礬カルミン液を加え24時間放置して行った。

上記操作により石灰化部位は黒色に着色し、核は赤紅色に着色する。

von Kossa 染色においても、Alizarin Red染色同様、c-erg-14群で対照群(RCA S)に比較して染色性の低下が認められ、石灰化物沈着量が抑制された。さらに、C11-L14群では完全に抑制されていた。明礬カルミンによる染色性は群間で差を認めないことから本効果は細胞数の違いによる染色性の差ではなく、c-erg-L14及びC11-L14が機能的に骨芽細胞の石灰化（細胞当たりのカルシウム沈着量）を抑制したことがわかる。

#### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1447

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GAATTCCGCG AACGAATAAT TATTATTAGC AATTATTAGC GATCAATAAT CTTGATCACA TT 62

ATG GCA AGC ACT ATT AAG GAA GCA TTA TCA GTG GTG AGT GAA GAC CAG	110
TCC TTG TTT GAG TGT GCC TAC GGA TCG CCC CAC CTT GCA AAG ACA GAA	158
ATG ACA GCC TCC TCT TCC AGT GAA TAT GGG CAA ACA TCA AAG ATG AGC	206
CCG CGC GTT CCC CAG CAG GAC TGG TTA TCA CAG CCC CCG GCC AGA GTT	254
ACC ATT AAG ATG GAG TGT AAC CCA AAC CAG GTT AAT GGG TCA AGG AAT	302
TCA CCT GAT GAC TGC AGC GTG GCA AAA GGA GGG AAA ATG GTT AGC AGT	350
TCA GAC AAT GTT GGG ATG AAC TAT GGA AGC TAC ATG GAA GAG AAG CAT	398
ATT CCG CCT CCA AAT ATG ACA ACC AAT GAA CGA AGA GTT ATT GTG CCA	446
GCA GAT CCT ACG TTA TGG AGC ACA GAC CAT GTA CGG CAG TGG CTG GAG	494
TGG GCA GTG AAG GAG TAT GGT CTT CCA GAC GTG GAC ATC TTG TTG TTC	542
CAG AAC ATT GAT GGG AAA GAG TTG TGT AAA ATG ACC AAA GAT GAC TTC	590
CAG AGA CTC ACG CCG AGC TAT AAC GCA GAT ATC CTC CTG TCA CAC CTA	638
CAC TAC CTC AGA GAG AGA GGA GCC ACT TTT ATT TTT CCA AAT ACA TCA	686
GTT TAC CCA GAA GCA ACG CAA AGA ATA ACA ACA AGG CCA GAT TTA CCT	734
TAT GAG CAA GCG AGG AGA TCA GCG TGG ACG AGT CAC AGC CAT CCC ACT	782
CAG TCA AAA GCT ACC CAA CCA TCA TCT TCA ACA GTG CCC AAA ACA GAA	830
GAC CAG CGT CCT CAG TTA GAT CCT TAT CAG ATT CTT GGA CCG ACC AGC	878
AGC CGT CTT GCA AAT CCA GGG AGT GGG CAG ATA CAG CTA TGG CAG TTC	926
CTA CTG GAG CTT CTG TCG GAC AGC TCC AAC TCC AAC TGC ATC ACC TGG	974
GAG GGC ACA AAT GGG GAG TTC AAG ATG ACA GAC CCT GAT GAA GTG GCT	1022
CGG CGT TGG GGA GAG AGG AAA AGC AAA CCT AAC ATG AAC TAT GAC AAA	1070
CTC AGC CGT GCA CTT CGC TAC TAC TAT GAC AAA AAT ATT ATG ACT AAA	1118
GTT CAT GGT AAA CGC TAT GCC TAC AAA TTT GAT TTC CAC GGA ATC GCT	1166
CAG GCC CTC CAG CCT CAC CCT CCA GAA TCA TCC ATG TAC AAA TAC CCA	1214
TCA GAC CTC CCC TAC ATG AGT TCC TAC CAT GCA CAC CCC CAG AAG ATG	1262
AAC TTT GTA GCT CCC CAT CCC CCT GCT TTG CCC GTA ACC TCA TCC AGC	1310

TTT TTT GCT GCC CCT AAT CCA TAC TGG AAT TCA CCA ACT GGA GGC ATC	1358
TAC CCC AAT ACC AGG CTG CCA GCT GCT CAT ATG CCT TCC CAT CTT GGC	1406
ACC TAC TAC TAA GTG GGGAAAGAAA GAAAGCGCCA AGAAAA	1447

配列番号 : 2

配列の長さ : 451

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ala Ser Thr Ile Lys Glu Ala Leu Ser Val Val Ser Glu Asp Gln	16
Ser Leu Phe Glu Cys Ala Tyr Gly Ser Pro His Leu Ala Lys Thr Glu	32
Met Thr Ala Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Gln Thr Ser Lys Met Ser	48
Pro Arg Val Pro Gln Gln Asp Trp Leu Ser Gln Pro Pro Ala Arg Val	64
Thr Ile Lys Met Glu Cys Asn Pro Asn Gln Val Asn Gly Ser Arg Asn	80
Ser Pro Asp Asp Cys Ser Val Ala Lys Gly Gly Lys Met Val Ser Ser	96
Ser Asp Asn Val Gly Met Asn Tyr Gly Ser Tyr Met Glu Glu Lys His	112
Ile Pro Pro Pro Asn Met Thr Thr Asn Glu Arg Arg Val Ile Val Pro	128
Ala Asp Pro Thr Leu Trp Ser Thr Asp His Val Arg Gln Trp Leu Glu	144
Trp Ala Val Lys Glu Tyr Gly Leu Pro Asp Val Asp Ile Leu Leu Phe	160
Gln Asn Ile Asp Gly Lys Glu Leu Cys Lys Met Thr Lys Asp Asp Phe	176
Gln Arg Leu Thr Pro Ser Tyr Asn Ala Asp Ile Leu Leu Ser His Leu	192
His Tyr Leu Arg Glu Arg Gly Ala Thr Phe Ile Phe Pro Asn Thr Ser	208
Val Tyr Pro Glu Ala Thr Gln Arg Ile Thr Thr Arg Pro Asp Leu Pro	224
Tyr Glu Gln Ala Arg Arg Ser Ala Trp Thr Ser His Ser His Pro Thr	240
Gln Ser Lys Ala Thr Gln Pro Ser Ser Ser Thr Val Pro Lys Thr Glu	256

Asp Gln Arg Pro Gln Leu Asp Pro Tyr Gln Ile Leu Gly Pro Thr Ser	272
Ser Arg Leu Ala Asn Pro Gly Ser Gly Gln Ile Gln Leu Trp Gln Phe	288
Leu Leu Glu Leu Leu Ser Asp Ser Ser Asn Ser Asn Cys Ile Thr Trp	304
Glu Gly Thr Asn Gly Glu Phe Lys Met Thr Asp Pro Asp Glu Val Ala	320
Arg Arg Trp Gly Glu Arg Lys Ser Lys Pro Asn Met Asn Tyr Asp Lys	336
Leu Ser Arg Ala Leu Arg Tyr Tyr Tyr Asp Lys Asn Ile Met Thr Lys	352
Val His Gly Lys Arg Tyr Ala Tyr Lys Phe Asp Phe His Gly Ile Ala	368
Gln Ala Leu Gln Pro His Pro Pro Glu Ser Ser Met Tyr Lys Tyr Pro	384
Ser Asp Leu Pro Tyr Met Ser Ser Tyr His Ala His Pro Gln Lys Met	400
Asn Phe Val Ala Pro His Pro Pro Ala Leu Pro Val Thr Ser Ser Ser	416
Phe Phe Ala Ala Pro Asn Pro Tyr Trp Asn Ser Pro Thr Gly Gly Ile	432
Tyr Pro Asn Thr Arg Leu Pro Ala Ala His Met Pro Ser His Leu Gly	448
Thr Tyr Tyr	451

配列番号 : 3

配列の長さ : 1528

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GAATTCCGCG AACGAATAAT TATTATTAGC AATTATTAGC GATCAATAAT CTTGATCACA TT	62
ATG GCA AGC ACT ATT AAG GAA GCA TTA TCA GTG GTG AGT GAA GAC CAG	110
TCC TTG TTT GAG TGT GCC TAC GGA TCG CCC CAC CTT GCA AAG ACA GAA	158
ATG ACA GCC TCC TCT TCC AGT GAA TAT GGG CAA ACA TCA AAG ATG AGC	206
CCG CGC GTT CCC CAG CAG GAC TGG TTA TCA CAG CCC CCG GCC AGA GTT	254

ACC ATT AAG ATG GAG TGT AAC CCA AAC CAG GTT AAT GGG TCA AGG AAT	302
TCA CCT GAT GAC TGC AGC GTG GCA AAA GGA GGG AAA ATG GTT AGC AGT	350
TCA GAC AAT GTT GGG ATG AAC TAT GGA AGC TAC ATG GAA GAG AAG CAT	398
ATT CCG CCT CCA AAT ATG ACA ACC AAT GAA CGA AGA GTT ATT GTG CCA	446
GCA GAT CCT ACG TTA TGG AGC ACA GAC CAT GTA CGG CAG TGG CTG GAG	494
TGG GCA GTG AAG GAG TAT GGT CTT CCA GAC GTG GAC ATC TTG TTG TTC	542
CAG AAC ATT GAT GGG AAA GAG TTG TGT AAA ATG ACC AAA GAT GAC TTC	590
CAG AGA CTC ACG CCG AGC TAT AAC GCA GAT ATC CTC CTG TCA CAC CTA	638
CAC TAC CTC AGA GAG ACT CCT CTT CCA CAT TTG ACT TCA GAT GAT GTT	686
GAT AAG GCC TTA CAA AAC TCT CCA CGG TTA ATG CAT GCT AGA AAC ACA	734
GGG GGA GCC ACT TTT ATT TTT CCA AAT ACA TCA GTT TAC CCA GAA GCA	782
ACG CAA AGA ATA ACA ACA AGG CCA GAT TTA CCT TAT GAG CAA GCG AGG	830
AGA TCA GCG TGG ACG AGT CAC AGC CAT CCC ACT CAG TCA AAA GCT ACC	878
CAA CCA TCA TCT TCA ACA GTG CCC AAA ACA GAA GAC CAG CGT CCT CAG	926
TTA GAT CCT TAT CAG ATT CTT GGA CCG ACC AGC AGC CGT CTT GCA AAT	974
CCA GGG AGT GGG CAG ATA CAG CTA TGG CAG TTC CTA CTG GAG CTT CTG	1022
TCG GAC AGC TCC AAC TCC AAC TGC ATC ACC TGG GAG GGC ACA AAT GGG	1070
GAG TTC AAG ATG ACA GAC CCT GAT GAA GTG GCT CGG CGT TGG GGA GAG	1118
AGG AAA AGC AAA CCT AAC ATG AAC TAT GAC AAA CTC AGC CGT GCA CTT	1166
CGC TAC TAC TAT GAC AAA AAT ATT ATG ACT AAA GTT CAT GGT AAA CGC	1214
TAT GCC TAC AAA TTT GAT TTC CAC GGA ATC GCT CAG GCC CTC CAG CCT	1262
CAC CCT CCA GAA TCA TCC ATG TAC AAA TAC CCA TCA GAC CTC CCC TAC	1310
ATG AGT TCC TAC CAT GCA CAC CCC CAG AAG ATG AAC TTT GTA GCT CCC	1358
CAT CCC CCT GCT TTG CCC GTA ACC TCA TCC AGC TTT TTT GCT GCC CCT	1406
AAT CCA TAC TGG AAT TCA CCA ACT GGA GGC ATC TAC CCC AAT ACC AGG	1454
CTG CCA GCT GCT CAT ATG CCT TCC CAT CTT GGC ACC TAC TAC TAA GTG	1502

**068791-7**

配列番号: 4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Ser Thr Ile Lys Glu Ala Leu Ser Val Val Ser Glu Asp Gln	16
Ser Leu Phe Glu Cys Ala Tyr Gly Ser Pro His Leu Ala Lys Thr Glu	32
Met Thr Ala Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Gln Thr Ser Lys Met Ser	48
Pro Arg Val Pro Gln Gln Asp Trp Leu Ser Gln Pro Pro Ala Arg Val	64
Thr Ile Lys Met Glu Cys Asn Pro Asn Gln Val Asn Gly Ser Arg Asn	80
Ser Pro Asp Asp Cys Ser Val Ala Lys Gly Gly Lys Met Val Ser Ser	96
Ser Asp Asn Val Gly Met Asn Tyr Gly Ser Tyr Met Glu Glu Lys His	112
Ile Pro Pro Pro Asn Met Thr Thr Asn Glu Arg Arg Val Ile Val Pro	128
Ala Asp Pro Thr Leu Trp Ser Thr Asp His Val Arg Gln Trp Leu Glu	144
Trp Ala Val Lys Glu Tyr Gly Leu Pro Asp Val Asp Ile Leu Leu Phe	160
Gln Asn Ile Asp Gly Lys Glu Leu Cys Lys Met Thr Lys Asp Asp Phe	176
Gln Arg Leu Thr Pro Ser Tyr Asn Ala Asp Ile Leu Leu Ser His Leu	192
His Tyr Leu Arg Glu Thr Pro Leu Pro His Leu Thr Ser Asp Asp Val	208
Asp Lys Ala Leu Gln Asn Ser Pro Arg Leu Met His Ala Arg Asn Thr	224
Gly Gly Ala Thr Phe Ile Phe Pro Asn Thr Ser Val Tyr Pro Glu Ala	240
Thr Gln Arg Ile Thr Thr Arg Pro Asp Leu Pro Tyr Glu Gln Ala Arg	256
Arg Ser Ala Trp Thr Ser His Ser His Pro Thr Gln Ser Lys Ala Thr	272
Gln Pro Ser Ser Ser Thr Val Pro Lys Thr Glu Asp Gln Arg Pro Gln	288

Leu Asp Pro Tyr Gln Ile Leu Gly Pro Thr Ser Ser Arg Leu Ala Asn	304
Pro Gly Ser Gly Gln Ile Gln Leu Trp Gln Phe Leu Leu Glu Leu Leu	320
Ser Asp Ser Ser Asn Ser Asn Cys Ile Thr Trp Glu Gly Thr Asn Gly	336
Glu Phe Lys Met Thr Asp Pro Asp Glu Val Ala Arg Arg Trp Gly Glu	352
Arg Lys Ser Lys Pro Asn Met Asn Tyr Asp Lys Leu Ser Arg Ala Leu	368
Arg Tyr Tyr Tyr Asp Lys Asn Ile Met Thr Lys Val His Pro Pro Glu	384
Ser Ser Met Tyr Lys Tyr Pro Ser Asp Leu Pro Tyr Met Ser Ser Tyr	400
His Gly Lys Arg Tyr Ala Tyr Lys Phe Asp Phe His Gly Ile Ala Gln	416
Ala Leu Gln Pro His Ala His Pro Gln Lys Met Asn Phe Val Ala Pro	432
His Pro Pro Ala Leu Pro Val Thr Ser Ser Ser Phe Phe Ala Ala Pro	448
Asn Pro Tyr Trp Asn Ser Pro Thr Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Thr Arg	464
Leu Pro Ala Ala His Met Pro Ser His Leu Gly Thr Tyr Tyr	478

配列番号 : 5

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

ATCTTGATCA CATTATGGCA AGC 23

配列番号 : 6

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

CACATTATGG CAAGCACTAT TAAGG 25

配列番号：7

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

CACTTAGTAG TAGGTGCCAA GATGG 25

20070619 240000

[請求の範囲]

1. 以下の(a)又は(b)のC-11タンパク質。
  - (a) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
  - (b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞石灰化抑制活性を有するタンパク質。
2. 請求項1に記載のタンパク質をコードする遺伝子。
3. 請求項1に記載のタンパク質を含む医薬。
4. 細胞石灰化抑制剤である請求項3に記載の医薬。
5. 以下の(a)又は(b)のc-ergタンパク質を含む細胞石灰化抑制剤。
  - (a) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
  - (b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞石灰化抑制活性を有するタンパク質。
6. 請求項1に記載のC-11タンパク質に対する抗体。
7. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項6に記載の抗体。
8. 細胞中のC-11遺伝子又はc-erg遺伝子の発現を測定することにより、前記細胞の石灰化を測定する方法。
9. 前記遺伝子の発現を、前記C-11遺伝子又はc-erg遺伝子に特異的なDNA配列に対するプローブを用いて、前記細胞中に発現されたC-11 mRNA又はc-erg mRNA量を測定することを特徴とする請求項8に記載の方法。
10. 前記遺伝子の発現を、前記C-11タンパク質又はc-ergタンパク質の細胞中での発現量を測定することにより測定する請求項8に記載の方法。
11. 前記細胞中のC-11遺伝子又はc-erg遺伝子の発現を、請求項6

又は7に記載の抗体を用いて前記細胞中に発現するC-11タンパク質又はc-ergタンパク質を測定することにより測定することを特徴とする請求項8に記載の方法。

12. 請求項8～11のいずれか一つの方法を用いて細胞の石灰化を測定することにより変形性関節症又は脊柱靱帯骨化症(OPLL)を診断する方法。

13. C-11タンパク質或いはc-ergタンパク質に対する抗体又はその両者を含む、細胞の石灰化測定用キット。

14. 以下の(a)から(d)までのいずれか一つに記載のタンパク質をコードする遺伝子を用いて形質転換された細胞を用いて、細胞石灰化抑制阻害活性を有する物質をスクリーニングする方法。

(a) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞石灰化抑制活性を有するタンパク質、

(c) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(d) アミノ酸配列(c)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞石灰化抑制活性を有するタンパク質。

15. ergタンパク質を含有する医薬。

16. erg遺伝子を含有する医薬。

17. C-11タンパク質又はc-ergタンパク質を含有する医薬。

18. C-11遺伝子又はc-erg遺伝子を含有する医薬。

19. c-ergタンパク質と、C-11タンパク質とに共通のアミノ酸配列を有するタンパク質を含有する医薬。

【開示内容の要約】

本発明は、細胞石灰化抑制活性タンパク質、及びそのタンパク質をコードする遺伝子を提供するものであり、ニワトリ由来のerg遺伝子であるc-erg遺伝子の新規アイソフォーム遺伝子（以下C-11遺伝子という）を見出し、その塩基配列を決定し、さらに、係る遺伝子によりコードされるタンパク質（C-11タンパク質という）の発現を確認した。また、骨芽細胞にc-erg又はC-11遺伝子を導入することにより細胞の石灰化が抑制されることを見出した。

2003.08.27.05.10.07